

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 4 月 12 日 (12.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/25459 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/82, A01H 5/00 438-0802 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Sizuoka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP99/05386
- (22) 国際出願日: 1999 年 9 月 30 日 (30.09.1999)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP]; 〒105-8422 東京都港区虎ノ門2丁目2番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 倉屋芳樹 (KURAYA, Yoshiki) [JP/JP]. 小鞠敏彦 (KOMARI, Toshihiko) [JP/JP]. 樋江井祐弘 (HIEI, Yukoh) [JP/JP]; 〒
- (74) 代理人: 社本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, JP, KR, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: VECTORS FOR TRANSFORMING PLANTS

(54) 発明の名称: 植物の形質転換用ベクター

(57) Abstract: Vectors for transforming plants with the use of agrobacteria which have been modified so as to elevate the possibility of the recognition of the border sequences of the vectors by vir proteins of the agrobacteria, thereby lowering the possibility of the transfer of DNAs other than T-DNA into plant chromosomes. More particularly, the above-vectors are those to be used in transforming plants which have right and left border sequences which can be recognized by the vir proteins of the agrobacteria, a T-DNA sequence which is located between these border sequences and into which a gene to be transferred into plants can be inserted, and a replication origin enabling the replication of the vectors in bacteria, characterized by having a plural number of left border sequences.

(57) 要約:

本発明は、アグロバクテリウムを利用した植物の形質転換のためのベクターを改変し、アグロバクテリウムのvirタンパク質群がベクターのボーダー配列を認識する確率を高め、T-DNA以外のDNAが植物の染色体に移される確率を低くする。

本発明は、詳細には、アグロバクテリウムのvirタンパク質群によって認識されうる右ボーダー配列及び左ボーダー配列、それらのボーダー配列間に配置され、かつ植物へ導入しようとする遺伝子が挿入可能なT-DNA配列、並びに細菌での前記ベクターの複製を可能にする複製開始点を有する植物の形質転換用ベクターであって、左ボーダー配列が複数個配置されたことを特徴とするベクターを提供する。

WO 01/25459 A1

明 細 書

植物の形質転換用ベクター

5 技術分野

本発明は、植物の形質転換用ベクターに関する。より具体的には、アグロバクテリウムを利用した植物の形質転換方法において有用なベクターに関する。本発明はさらに、本発明のベクターを使用する植物の形質転換方法に関する。本発明は特に、食品として摂取されることのある遺伝子組換え植物を作出するのに有用である。

背景技術

土壌細菌アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) が多くの双子葉植物に根頭癌腫病 (Crown gall disease) を引き起こすことは古くから知られており、1970年代には、Tiプラスミドが病原性に関与していること、さらにTiプラスミドの一部であるT-DNAが植物ゲノムに組み込まれることが発見された。その後このT-DNAには癌腫の誘発に必要なホルモン (サイトカイニンとオーキシン) の合成に関与する遺伝子が存在し、細菌遺伝子でありながら植物中で発現することが明らかにされた。T-DNAの切り出しと植物への伝達にはTiプラスミド上のヴィルレンス領域 (Vir領域) に存在する遺伝子群が必要であり、またT-DNAが切り出されるためにはT-DNAの両端に存在するボーダー配列が必要である。このT-DNAの両端に存在するボーダー配列をそれぞれ右ボーダー配列、左ボーダー配列という。他のアグロバクテリウム属細菌である *Agrobacterium* *rizogenesis* も Ri プラスミドによる同様なシステムを有している。

より具体的には、vir領域に存在する遺伝子群を基に造られるタンパク質群 (virタンパク質群) が左右のボーダー配列を認識し、その間のT-DNAを植物ゲノムに組み込む。この性質をもとに、T-DNA中に外来遺伝子を挿入することで植物の形質転換ができるようになり、アグロバクテリウムによる植物の形質転換が発展してきた。

しかし、近年、ある種の植物を形質転換する場合に、ボーダー配列で T-DNA が切り出されずに、T-DNA が左ボーダー配列の外側の部分も含めて植物の染色体に移される場合があることが分かってきた (Ramanathan et al. Plant Molecular Biology 28, 1149-1154 (1995)、Kononov et al. Plant Journal 11, 945-957 (1997) など)。T-DNA 部分以外の不要な DNA が植物の染色体に移ることにより、形質転換により作成された遺伝子組換え植物が予想していない形質をもつことが懸念され、遺伝子組換え植物を利用した食品の消費者の認識 (パブリックアクセプタンス) にも重要な影響を与えることが考えられる。このためアグロバクテリウム内の T-DNA 部分以外の不要な DNA が植物の染色体に移らないようにする方法が要求されている。

T-DNA 以外の DNA 部分が植物の染色体に移るのは、アグロバクテリウムの vir タンパク質群がボーダー配列を認識していないためと考えられる。しかしながら、このような場合に対処し、ボーダー配列以外の DNA 断片が移らない、あるいは移りにくいように工夫されたベクターは開発されていない。

発明者は、T-DNA の外側の DNA が T-DNA と一緒に植物の染色体に移るのは、アグロバクテリウムの vir タンパク質群がボーダー配列を認識していないためと考えた。そこで、アグロバクテリウムを利用した植物の形質転換において用いるベクターを改変し、アグロバクテリウムの vir タンパク質群がベクターのボーダー配列を認識する確率を高め、目的とする DNA 以外の DNA が植物の染色体に移される確率を低くすることを課題とし、鋭意検討した。その結果、2つのボーダー配列のうち、形質転換用ベクターにおいて左ボーダー配列を複数並べることで、T-DNA の外側の DNA が植物の染色体に挿入されにくくなることを見出し、本発明を完成するに至った。

発明の概要

本発明は、アグロバクテリウムの機能を利用した植物の形質転換に用いるベクターであって、目的とする形質転換のためには不要な DNA、すなわち T-DNA 以外の DNA が植物染色体へ挿入されにくいように改良された左ボーダー配列を有することを特徴とする植物の形質転換用ベクターを提供する。より詳細には、vir タ

ンパク質群によって認識されうる右ボーダー配列及び左ボーダー配列、それらのボーダー配列間に配置され、かつ植物へ導入しようとする遺伝子が挿入可能な T-DNA 配列、並びに細菌（アグロバクテリウム及びベクター生産用細菌等）でベクターの複製を可能にする複製開始点（ori）を有するベクターであって、T-DNA 5 以外の DNA が植物染色体へ挿入されにくいように改良された左ボーダー配列を有することを特徴とする植物の形質転換用ベクターを提供する。

図面の簡単な説明

図 1 は、実施例で用いた pSLB0 ベクターを表す。pSB11 の T-DNA 内部にユビキチンプロモーターとユビキチンイントロンによりハイグロマイシン耐性遺伝子（HPT）を発現させるカセットを持ち、さらに制限酵素 *Stu*I で認識される部位に、ユビキチンプロモーターによりカタラーゼイントロンを含む GUS 遺伝子を発現させるカセットを挿入したものである。

図 2 は、pSLB0 ベクター、pSLB2 ベクター、pSLB3 ベクターの、各々の左ボーダー配列（以下「LB」ということもある。）付近の地図を表す。pSLB0 の LB と GUS 発現カセットの間の制限酵素 *Pvu*II で認識される部位に、左ボーダー配列を 2 つ又は 3 つ持つ DNA 断片を挿入したものである。合成 DNA 断片により新たに挿入された左ボーダー配列（以下「sLB」と表す）が 2 つ、すなわち LB が合計 3 つのものが pSLB2、合成 DNA 断片により新たに挿入された sLB が 3 つ、すなわち LB の合計が 4 つのものが pSLB3 である。

発明を実施するための好ましい形態

（1）ベクターの作製

本発明のベクターは、目的とする形質転換のためには不要な DNA、すなわち T-DNA 25 以外の DNA が植物染色体へ挿入されにくいように機能する左ボーダー配列を有する。vir タンパク質群によって認識され得る塩基配列（例えば、公知の左ボーダー配列）が複数個配置された配列を含むよう、左ボーダー配列が改良されたベクターは、本発明の好ましい一態様である。

左ボーダー配列が複数個配置された DNA 断片は、公知のボーダー配列を基に

種々の公知の方法を用いて作成することができる。例えば、既存の Ti プラスミド中に既に存在する左ボーダー配列と同一の配列の一本鎖 DNA を合成し、そしてこれを二本鎖とし、必要であれば複数個連結することにより作成することができる。このように作成した DNA 断片を、植物形質転換用ベクターの T-DNA の下流の

- 5 既存の左ボーダー配列の前及び／又は後ろの付近に、適当な制限酵素部位等を利用して挿入することにより本発明のベクターを容易に作成することができる。

- 左ボーダー配列を改良して本発明のベクターとすることができる植物転換用ベクターは、少なくとも、vir タンパク質群によって認識されうる左右ボーダー配列、その間に配置され、かつ植物へ導入しようとする遺伝子が挿入可能な T-DNA 配列、並びにベクター生産用細菌（例えば、大腸菌）で機能可能な複製開始点を有することが必要である。好ましくは、アグロバクテリウムで機能することができる複製開始点を有するものがよい。
- 10

- このような条件を満たすベクターであれば、左ボーダー配列の改良は、種々のベクターのいずれにも適用することができる。例えば、アグロバクテリウムを利用する植物の形質転換方法には（１）左右ボーダー配列を持ち、T-DNA 中に外来遺伝子を挿入したサイズの小さな中間クローニングベクター、及び vir 領域を有するアクセプター Ti プラスミドから、相同組換えによりハイブリッド Ti プラスミドベクターを形成し、これを含むアグロバクテリウムを植物に感染させる方法；（２）vir 領域を有さないサイズの小さな Ti プラスミド（ミニプラスミド又はマイクロ Ti プラスミドと呼ばれ、多くの細菌内で複製可能である。）の T-DNA 中に外来遺伝子を挿入し、これを、vir 領域を有するが T-DNA を欠失させたプラスミドをあらかじめ導入したアグロバクテリウムへさらに導入し、これらを含むアグロバクテリウムを植物に感染させる方法；又は（３）左右のボーダー配列を持ち、T-DNA 中に外来遺伝子を挿入したサイズの小さなクローニングベクター、及び vir 領域の一部（vir 領域の全長から一部を欠失させたもの）を有するアクセプター Ti プラスミドから、相同組換えによりハイブリッド Ti プラスミドベクターを形成し、これを vir 領域（全長）を有するが T-DNA を欠失させたプラスミドをあらかじめ導入したアグロバクテリウムへさらに導入し、これらを含むアグロバクテリウムを植物に感染させる方法等があるが、これらの方法における種々の
- 15
- 20
- 25

ベクターの左ボーダー配列の改良が可能である。サイズの小さな Ti プラスミドの左ボーダー配列を改良したものは、T-DNA 中の外来遺伝子の改良操作等において取り扱いが容易であり、本発明のベクターの好ましい一態様である。このようなサイズの小さな Ti プラスミドの例としては、pBI101、pBI121 (いずれも

5 CLONTECH 社)、又は後述する実施例中で用いた pSB11 がある。

また、本発明は、Ti プラスミドのみならず、Ri プラスミドにおいても適用することができる。

本発明のベクターは、形質転換体を選択可能とするマーカー遺伝子、例えば抗生物質耐性遺伝子、発色性遺伝子等を T-DNA 配列中に含んでもよい。具体的には、
10 通常使用されるものを常法により用いることができ、テトラサイクリン、アンピシリン、又はカナマイシン若しくはネオマイシン、ハイグロマイシン又はスペクチノマイシン等の抗生物質耐性遺伝子等の他、ルシフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ、グリーンフルオレッセンスプロテイン (GFP)、 β -ラクタマーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 等が例示される。また、
15 これとは別に、T-DNA 配列の外側、好ましくは左ボーダー配列の下流にマーカー遺伝子を含んでもよい。このような位置に配置されたマーカー遺伝子は改良されたボーダー配列の効果を検討するために有用である。

ここで、複製開始点とは、複製開始反応が起こる特定の DNA 領域をいい、一般には Ori と呼ばれる領域をいう。

20 (2) 形質転換

本発明のベクターは、その T-DNA 中に目的とする形質転換を行うための外来遺伝子を挿入して使用する。挿入する外来遺伝子は、通常、宿主植物体で機能可能なプロモーターとその下流の構造遺伝子 (植物へ付与しようとする形質をコードする) を含む。必要に応じ、遺伝子 (群) を複数個連結し、及び/又はプロモーターとその下流の構造遺伝子との間に発現効率を高めるための配列を介在させ、
25 T-DNA 間へ挿入してもよい。

外来遺伝子を含む本発明のベクターは、目的とする植物に導入するためにその植物への感染能力を有するアグロバクテリウム属に属する細菌 (例えば *Agrobacterium tumefaciens*) 内へ導入される。この操作には、当業者に周知の

種々の方法を利用することができる。接合操作等を利用してアグロバクテリウム内に移してもよいし、可能であれば、外来遺伝子を含む本発明のベクターで直接アグロバクテリウムを形質転換してもよい。

5 本発明のベクターを含んだアグロバクテリウムを植物に感染させるには、従来
の技術を利用することができる。例えば、植物体の一部を傷つけ、そこに細菌を
感染させる方法、カルスに感染させる方法、プロトプラストと細菌を共培養する
方法、又は葉組織の小片を細菌とともに培養する方法がある。これらの方法から
得られた形質転換細胞は、適当なマーカーを指標とするか、又は所望の形質を発
現しているか否かによって他の細胞から選択することができる。形質転換細胞は
10 さらに、従来技術を利用して分化させることで組換え植物体とすることができる。

植物の染色体 DNA に外来遺伝子を含む T-DNA が組み込まれる際には、*vir* 領域
が必要である。*vir* 領域は、外来遺伝子を有するベクターから供給され得るし、
また、外来遺伝子を有するベクターとは異なるベクターから供給され得る。

本発明のベクターを用いて形質転換された植物細胞は、従来技術を利用して分
15 化させることで、組換え植物体とすることができる。形質転換植物は、適当なマ
ーカーを指標とするか、又は所望の形質を発現しているか否かによって他のもの
から選択することができる。

目的とする形質転換のためには不要な DNA が植物染色体へ挿入されたか否かの
解析は、当業者に周知の種々の方法を用いて行うことができる。例えば、ボーダ
20 ー配列の外側のベクター DNA 配列を基にオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、
これを用いた PCR により形質転換植物の染色体 DNA を解析することができる。ま
た、T-DNA 配列の外側にマーカー遺伝子を含むベクターを用いて形質転換した場
合は、その発現の有無により、解析することができる。

本発明は、目的とする形質転換のためには不要な DNA が挿入されにくいという
25 機能を有するが、「挿入されにくい」とは、左ボーダー配列が改良されていない
ベクターを用いた場合と比較して、不要な DNA が宿主植物染色体に挿入される割
合が少ないこと、挿入される長さが短いこと、若しくは挿入されないこと、及び
／又は、左ボーダー配列が改良されていないベクターを用いた場合と比較して、
意図しない形質転換が起こる割合が少ないこと、起こったとしても軽微であるこ

と、若しくは起こらないことをいう。また、「目的とする形質転換のためには不要な DNA」とは、ベクター中の T-DNA 配列の外側に位置する DNA（すなわち T-DNA 以外の DNA）部分又は断片をいう。それ自体で機能可能であるか又はポリペプチド又はタンパク質をコードしているかは問わない。

- 5 本発明の形質転換方法により形質転換される植物は、トウモロコシ、モロコシ、ライ小麦、大麦、オート麦、ライ麦、小麦、タマネギ、若しくはイネ等の単子葉植物又は大豆、アルファルファ、タバコ、アブラナ、ヒマワリ、ジャガイモ、コショウ、若しくはトマト等の双子葉植物のいずれでもよい。本発明の方法によれば目的とする形質転換のためには不必要な DNA が植物染色体へ挿入されにくく、
- 10 また形質転換により作成された遺伝子組換え植物は予想していない形質をもつことが少ないことから、本発明の方法は、アグロバクテリウムによる形質転換では T-DNA 部分以外の不要な DNA が植物の染色体に移ることが特に懸念される、他の生物に食品として摂取されうる植物の形質転換に適している。特に、単子葉植物、とりわけイネの形質転換に適している。
- 15 なお、本明細書で「植物」というときは、特に明示しない限り、植物体（個体）の他、その種子（発芽種子、未熟種子を含む。）、部分（葉、根、茎、花、雄蕊、雌蕊、それらの片を含む。）、植物培養細胞、カルス、プロトプラストを含む。

実施例

20 実施例 1

（1）ベクターの作製

- プラスミドベクター pSB11 (Genbank Accession No. AB027256, Komari et al. Plant Journal 10, 165-174 (1996)) の T-DNA 内部にユビキチンプロモーターとユビキチンイントロン (Christensen et al, Plant Molecular Biology 18, 675-689 (1992)) によりハイグロマイシン耐性遺伝子 (HPT) を発現させるカセット
- 25 を持つプラスミドを作成し、さらに制限酵素 *Stu*I で認識される部位に、ユビキチンプロモーターによりカタラーゼイントロンを含む GUS 遺伝子 (Ohta et al. Plant Cell Physiology 31, 805-813 (1990)) を発現させるカセットを挿入したプラスミドを作成した (pSLB0、図 1、配列番号 1)。pSLB0 の塩基配列を配列番

号 1 に示す。

次に Ti プラスミド pTiAch5 の塩基配列 (Genbank Accession No. K00548) を基に左ボーダー配列 (以下「LB」と略す。) を含む合成 DNA と、この合成 DNA に相補的な合成 DNA を作成し、2 つをアニーリング、平滑化させて、LB 配列を 2 つあるいは 3 つ持つ DNA 断片を作成した。合成した 2 つの合成 DNA の塩基配列を配列番号 2 及び 3 に示す。この DNA 断片を pSLB0 の LB と GUS 発現カセットの間の制限酵素 PvuII で認識される部位に挿入し、LB を複数付加させたベクターを作成した。合成 DNA による LB (以下「sLB」ということもある。) が 2 つ、すなわち LB が合計 3 つのものを pSLB2、sLB が 3 つ、すなわち LB の合計が 4 つのものを pSLB3 とした (pSLB0、pSLB2、pSLB3 の合成 LB 付近の地図を図 2 に示す)。これら 3 種のプラスミドをそれぞれ、プラスミドベクター pSB1 (Genbank Accession No. AB027255、Komari et al. Plant Journal 10, 165-174 (1996)) を導入した *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 に導入し、以下の試験に供試した。

(2) 形質転換

LBA4404 (pSLB0)、LBA4404 (pSLB2)、LBA4404 (pSLB3) を用い、イネ品種「朝の光」の未熟胚由来のカルスをそれぞれ形質転換した。形質転換は樋江井らの方法 (Hiei et al. Plant Journal 6, 271-282 (1994)) に従った。

(3) 形質転換体での GUS 遺伝子発現の解析

実施例 2 で得られたハイグロマイシン抵抗性植物の葉の一部を X-Gluc により染色し、GUS 遺伝子の発現を調べた。LBA4404 (pSLB0) で形質転換した植物では 340 個体のうち 17 個体が GUS 遺伝子の発現を示した。このことは LB が一つである従来のベクターで形質転換された植物の 5% ではボーダー配列外のアグロバクテリウム由来の DNA が植物に導入されたことを示す。これに対し、LBA4404 (pSLB2)、LBA4404 (pSLB3) を形質転換した植物では合成 LB の数が増えるに従い GUS 遺伝子の発現を示す個体は減少した (表 1)。これは合成 LB をベクターに入れることにより左ボーダー配列外の DNA が植物に移りにくくなったことを示す。

(4) GUS 遺伝子発現を示さなかった個体のゲノミック DNA の解析

上記試験で GUS 遺伝子の発現を示さなかった個体の中には左ボーダー配列外の

DNA が植物染色体に導入されているが GUS 遺伝子を発現させるユビキチンプロモーターまでは至らないものが含まれていることが考えられる。そこで、GUS 遺伝子の発現を示さなかった植物からランダムに、それぞれ 60 前後の独立の形質転換体を選んでゲノミック DNA を抽出し、PCR 解析を行った。PCR 解析に用いたプライマーは本来の LB と合成 LB の間から GUS 遺伝子の一部までを増幅できるように作成した。プライマーの配列を配列番号 4 及び 5 に示す。

PCR 解析の結果、LBA4404 (pSLB0) で形質転換した植物では 67 個体中 7 個体 (10.4%) で DNA の増幅が確認され、LB が一つである従来のベクターでは作出された形質転換体の 1 割以上の高頻度で目的とする T-DNA 以外のアグロバクテリウム由来 DNA が染色体に組み込まれていることが明らかとなった。これに対し、合成 LB をもつ LBA4404 (pSLB2) 及び LBA4404 (pSLB3) で形質転換した植物では、そのような DNA の増幅が確認された個体はなかった。

これらの結果を表 1 及び表 2 に示した。

表 1. GUS 遺伝子発現の解析

ベクター	形質転換個体数	GUS 発現個体の割合 (%)
pSLB0	340	5.0
pSLB2	327	1.2
pSLB3	370	0.8

表 2. ゲノミック DNA の解析

ベクター	DNA 抽出個体数	PCR により DNA が増幅された個体数
pSLB0	67	7
pSLB2	55	0
pSLB3	58	0

以上の結果から、本発明により、ボーダー配列外の DNA が植物染色体に組み込まれることが少なくなり、目的とする T-DNA だけを導入できる効率を向上させることが可能となった。

本明細書では、主として、複数の左ボーダー配列を使用する例によって本発明を説明した。この場合の複数の左ボーダー配列は、それぞれ同一のアグロバクテ

- リウム由来のものであってもよいし、それぞれ異なるアグロバクテリウム由来のものであってもよい。しかし、本発明の主眼は、植物形質転換用ベクターの左ボーダー配列を、*vir* タンパク質群によってより確実に認識されるように改良し、それによって T-DNA 以外の不要な DNA が植物染色体に移らないようにできること
- 5 である。したがって、そのように機能することのできる改良された左ボーダー配列を有するベクターであれば、本発明の範囲に含まれる。改良された左ボーダー配列は、上に説明したものの他、例えば、(1) プラスミド中に既に存在する左ボーダー配列において、一又は複数の塩基を欠失、置換若しくは付加することにより、*vir* タンパク質群がより確実に認識しうる塩基配列としたもの；(2) プラスミド中に既に存在する左ボーダー配列付近の配列において、一又は複数の塩基を欠失、置換、挿入若しくは付加することにより、*vir* タンパク質群がより確実に左ボーダー配列を認識しうるようにしたもの；(3) *vir* タンパク質群によって認識され得る塩基配列を複数個含むような配列としたもの；及び(4) これらの任意の組み合わせを含み得る。
- 10

請 求 の 範 囲

1. アグロバクテリウムの機能を利用した植物の形質転換に用いるベクターであって、T-DNA 以外の DNA が植物染色体へ挿入されにくいように左ボーダー配列が改良されたことを特徴とする植物の形質転換用ベクター。

2. アグロバクテリウムの *vir* タンパク質群によって認識されうる右ボーダー配列及び左ボーダー配列、それらのボーダー配列間に配置され、かつ植物へ導入しようとする遺伝子が挿入可能な T-DNA 配列、並びに細菌での前記ベクターの複製を可能にする複製開始点を有する植物の形質転換用ベクターであって、T-DNA 以外の DNA が植物染色体へ挿入されにくいように左ボーダー配列が改良されたことを特徴とする前記ベクター。

3. 左ボーダー配列の改良が、左ボーダー配列が複数個配置されたことを含む、請求項 1 又は 2 に記載のベクター。

4. T-DNA 配列中に、形質転換体を選択可能とするマーカー遺伝子を含む請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のベクター。

5. 複製開始点が、ベクター生産用細菌及びアグロバクテリウムを含む細菌でのベクターの複製を可能にするものである、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載のベクター。

6. 請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載のベクターを有するアグロバクテリウムを用いる植物の形質転換方法。

7. 請求項 6 に記載の方法により形質転換された植物。

図 1

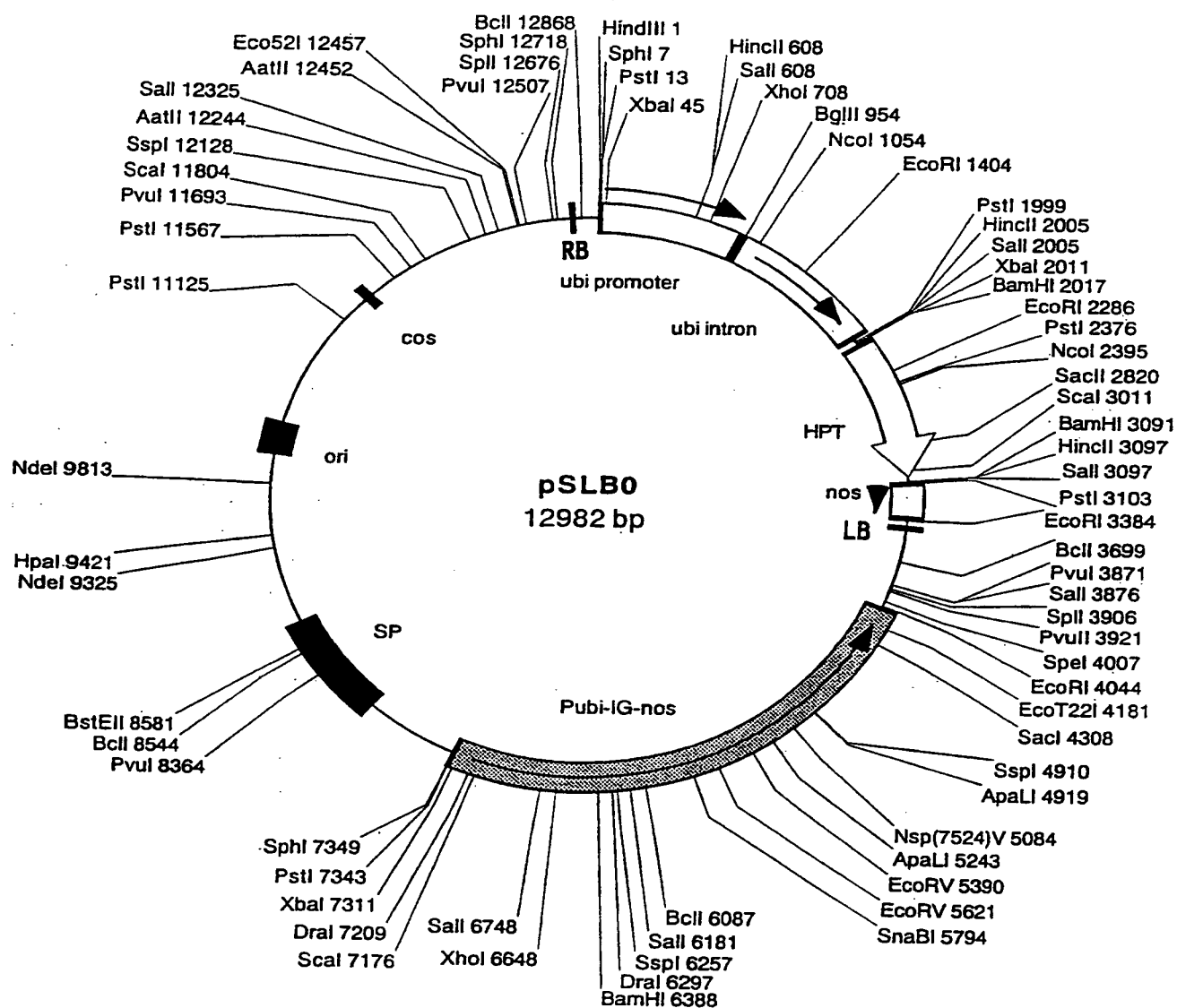
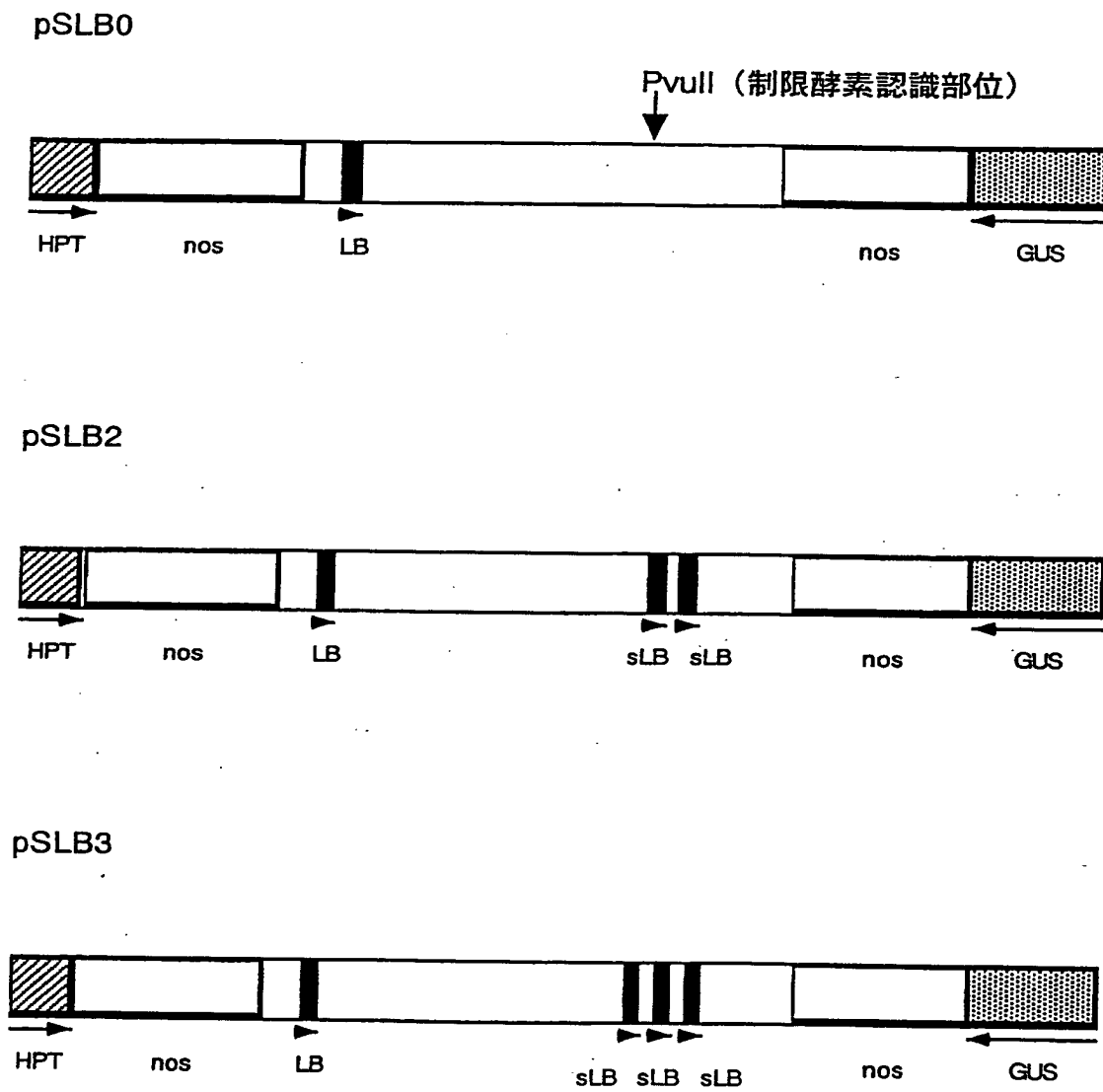




図 2



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Tobacco Inc.

<120> 植物の形質転換用ベクター

<130> YCT-441

<160> 5

<210> 1

<211> 12982

<212> DNA

<400> 1

```

aagcttgcat gcctgcagtg cagcgtgacc cggtcgtgcc cctctctaga gataatgagc    60
attgcatgtc taagttataa aaaattacca catatTTTTT ttgtcacact tgtttgaagt    120
gcagtttatc tatctttata catatattta aactttactc tacgaataat ataatctata    180
gtactacaat aatatcagtg ttttagagaa tcatataaat gaacagttag acatggctca    240
aaggacaatt gagtattttg acaacaggac tctacagttt tatcttttta gtgtgcatgt    300
gttctccttt ttttttgcaa atagcttcac ctatataata ctccatccat tttattagta    360
catccattta gggtttaggg ttaatggttt ttatagacia atttttttag tacatctatt    420
ttattctatt ttagccctca aattaagaaa actaaaactc tattttagtt tttttattta    480
ataatttaga tataaaatag aataaaataa agtgactaaa aattaaaca atacccttta    540
agaaattaaa aaaactaagg aaacattttt ctgttttcga gtagataatg ccagcctgtt    600
aaacgccgtc gacgagtcia acggacacca accagcgaac cagcagcgtc gcgtcgggcc    660
aagcgaagca gacggcacgg catctctgtc gctgccctctg gacccctctc gagagtccg    720
ctccaccgtt ggacttgctc cgtctctggc atccagaaat tgcgtggcgg agcggcagac    780
gtgagccggc acggcaggcg gcctcctcct cctctcacgg cacggcagct acgggggatt    840
cctttcccac cgtcctctcg ctttcccttc ctgcccggcc glaataaata gacacccctt    900
ccacaccctc ttcccccaac ctctgttgtt tctggagcgca cacacacaca accagatctc    960

```



ccccaaatcc acccgicggc acctccgctt caaggtacgc cgctcgtcct cccccccccc 1020
ccctctctac ctctctctaga tcggcggtcc ggiccatggt tagggcccgg tagttctact 1080
tctgttcatg ttigtgttag atccgigtgt gigttagatc cgtgctgcta gcgttcgtac 1140
acggatgcga cctgtacgtc agacacgttc tgattgctaa cttgccagtg ttctcttttg 1200
gggaatcctg ggatggctct agccgticcg cagacgggat cgatttcatg attttttttg 1260
tttcgttgca tagggtttgg ttgccccctt tccctttatt caataatgc cgtgcacttg 1320
tttctcgggt catcttttca tgcctttttt tgtcttggtt gtgatgatgt ggtctggttg 1380
ggcggctggt ctagatcgga gtagaattct gtitcaaact acctgggtga ttatttaatt 1440
ttggatctgt atgtgtgtgc catacatatt catagtacg aattgaagat gatggatgga 1500
aataatcgatc taggataggt atacatgttg atgcgggttt tactgatgca tatacagaga 1560
tgctttttgt tcgcttggtt gtgatgatgt ggigtggttg ggcggctggt caticgttct 1620
agatcggagt agaatactgt ttcaaactac ctgggtgtat tattaatttt ggaactgtat 1680
gtgtgtgtca tacatcttca tagttacgag tttaagatgg atggaaatat cgatctagga 1740
taggtataca tgttgatgtg ggttttactg atgcatatac atgatggcat atgcagcatc 1800
tattcataatg ctctaacctt gagtacctat ctattataat aaacaagtat gttttataat 1860
tattttgatc ttgatatact tggatgatgg cataatgcagc agctatatgt ggattttttt 1920
agccctgcct tcatacgcta ttattttgct tggctactgt tcttttctcg atgtcacc 1980
tgttgttttg tgttacttct gcaggctgac tctagaggat ccgctgccgg gggcaatgag 2040
ataigaaaaa gcctgaactc accgcgacgt ctgtcgagaa gttcttgatc gaaaagtctg 2100
acagcgtctc cgacctgatg cagctctcgg agggcgaaga atctcgtgct ttcagcttctg 2160
atgtaggagg gcgtggatat gtccctgcggg taaatagctg cgccgatggt ttctacaaag 2220
atcgttaatgt ttaicggcac ttigcatcgg ccgcgctccc gattccggaa gtgcttgaca 2280
ttggggaatt cagcgagagc ctgacctatt gcattctccc ccgtgcacag ggtgtcacgt 2340
tgcaagacct gcctgaaacc gaactgcccg ctgttctgca gccggctcgc gaggccatgg 2400
atgcgatcgc tgcggccgat cttagccaga cgagcgggtt cggcccatc ggaccgcaag 2460
gaatcggta atactatca tggcgtgatt tcataatgcgc gatgtctgat cccatgtgt 2520
atcactggca aactgtgatg gacgacaccg tcagtgcgtc cgtcgcgcag gcctcgtatg 2580
agctgatgct ttgggcccag gactgccccg aagtcgggca cctcgtgcac gcggatttctg 2640
gtccaacaa tgtcttgacg gacaatggcc gcataacagc ggtcattgac tggagcggag 2700

cgatgttcgg ggattcccaa tacgaggtcg ccaacatctt ctctcggagg ccgtgggttg 2760
 ctgtatgga gcagcagacg cgctacttcg agcggaggca tccggagctt gcaggatcgc 2820
 cgcggctccg ggcgtataatg ctcgcatttg gtcttgacca actctatcag agcttgggtg 2880
 acggcaattt cgatgatgca gcttgggcgc agggtcgatg cgacgcaatc gtccgatccg 2940
 gagccgggac tgtcgggcgt acacaaatcg cccgcagaag cgcggccgtc tggaccgatg 3000
 gctgtgtaga agtactcgcc gatagtggaa accgacgcc cagcactcgt ccgagggcaa 3060
 aggaatagag tagatgccga ccgaacaacg gatccgtcga cctgcagaga tcgttcaaac 3120
 atttggcaat aaagtctctt aagattgaat cctgttgcg gtcttgcgat gattatcata 3180
 taatttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgaatgcat gacgttattt 3240
 atgagatggg tttttatgat tagagtcctg caattataca tttaatcgc gatagaaaac 3300
 aaaatatagc gcgcaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg tgtatctat gttactagat 3360
 cgatgataag ctgtcaaaca tgagaattca gtacattaaa aacgtccgca atgtgttatt 3420
 aagttgtcta agcgtcaatt tgtttacacc acaatatatc ctgccaccag ccagccaaca 3480
 gctcccccgc cggcagctcg gcacaaaatc accactcgat acaggcagcc catcagtcg 3540
 ggacggcgtc agcgggagag ccgttgttaag gcggcagact ttgctcatgt taccgatgct 3600
 attcggaaga acggcaacta agctgccggg ttigaaacac ggatgatctc gcggagggtt 3660
 gcatgttgat tgaacgatg acagagcggt gctgccctgt atcaaatac atctccctcg 3720
 cagagatccg aattatcagc ctctttattc attctctgct taaccgtgac aggctgtcga 3780
 tcttgagaac tatgccgaca taataggaaa tcgctggata aagccgctga ggaagctgag 3840
 tggcgtatt tctttagaag tgaacgttga cgatcgtcga ccgtaccccg atgaattaat 3900
 tcggacgtac gtcttgaaca cagctggata ctacttggg cgattgtcat acatgacatc 3960
 aacaatgtac ccgtttgtgt aaccgtctct tggaggttcg tatgacacta gtggttcccc 4020
 tcagcttgcg actagatgtt gaggaattcg atctagtaac atagatgaca ccgcgcgcga 4080
 taatttatcc tagtttgcgc gctatatctt gttttctatc gcgtattaaa tgtataattg 4140
 cgggactcta atcataaaaa cccatctcat aaataacgtc atgcattaca tgttaattat 4200
 tacatgctta acgttaattc acagaaatta tatgataatc atcgcaagac cggcaacagg 4260
 attcaatctt aagaaacttt attgccaaat gtttgaacga tcaattcgag ctcggtacgc 4320
 aatcccccac cgaggctgtt gccgacgatg gtgcgccagg agagttgttg attcattggt 4380
 tgccctccctg ctgcgggttt tcaccgaagt tcatgccagt ccagcggttt tgcagcagaa 4440

aagccgccga cttcggtttg cggtcgcgag tgaagatccc ttctttgtta ccgccaacgc 4500
gcaataatgcc ttgcgaggtc gcaaaatcgg cgaaattcca taccgtgtca ccgacgacgg 4560
cgctgacgcg atcaaagacg cggtgatata tatccagcca tgcacactga tactcttcac 4620
tccacatgtc gggtgtacatt gagtgcagcc cggctaacgt atccacgccg taticgggtga 4680
tgataatcgg ctgatgcagt ttctcttgcc aggccagaag ttctttttcc agtaccttct 4740
ctgccgtttc caaatcgccg ctttggacat accatccgtataaacgggtc aggccacagca 4800
catcaaagag atcgctgatg gtatcgggtg gagcgtcgca gaacattaca ttgacgcagg 4860
tgatcggacg cgtcgggtcg agtttiacgcg ttgcttccgc cagtggcgaa atattcccgt 4920
gcactttcgg acgggtatcc ggttcgttgg caatactcca catcaccacg ctggggtgg 4980
ttttgtcacg cgctatcagc tctttaatcg ccgttaagtg cgcttgcgtga gtttccccgt 5040
tgactgcctc ttcgctgtac agttctttcg gcttgttgcc cgcttcgaaa ccaatgccta 5100
aagagagggt aaagccgaca gcagcagttt catcaatcac cagcatgcca tgttcatctg 5160
cccagtcgag catctcttca gcgttaagggt aatgcgagg acggtaggag ttggcccca 5220
tccagtcctat taatgcgtgg tcgtgcacca tcagcacgtt atcgaatcct ttgccacgtata 5280
agtcgcctc ttcatgacga ccaaagccag taaagtagaa cggtttgigg ttaatcagga 5340
actgttcgcc cttcactgcc actgaccgga tgcgcgacgc aagcgggtag atatcacact 5400
ctgtctggct ttggctgtg acgcacagtt catagagata accttcccc ggttgccaga 5460
ggtcgaggtt caccacttgc aaagtcctcg tagtgccttg tccagttgca accacctgtt 5520
gatccgcctc acgcagtta acgctgacat caccattggc caccacctgc cagtcaacag 5580
acgcgtgggt acagtccttg gcgacatgcg tcaccacggt gatatcgctc acccaggtgt 5640
tcggcggtgt gtagagcatt acgctgcgat ggattccggc atagttaaag aaatcatgga 5700
agtaagactg ctttttcttg ccgttttcgt cggtaatcac cattcccggc gggatagctt 5760
gccagttcag ttcggtgttc acacaaacgg tgatacgtac acttttcccc gcaataacat 5820
acggcggtgac atcggttca aatggcgat agccgcccgt atgctccatc acttctgtat 5880
tattgaccca cactttgccg taatgagtga ccgcatcgaa acgcagcacg atacgctggc 5940
ctgcccaccc ttctgggtata aagacttcgc gctgatacca gacgttgcgc gcataattac 6000
gaataatctgc atcggcgaac tgatcgttaa aactgccttg cacagcaatt gcccggttt 6060
cttgtaacgc gctttccac caacgctgat caattccaca gttttcgcga tccagactga 6120
atgcccacag gccgtcgagt tttttgattt cacgggttgg ggtttctaca ggacggacga 6180

gtcgacgggtt ctgtaactat catcatcatt atagacacac gaaataaagt aatcagattt 6240
 tcagttaaag ctaigttaata ttacaccat aaccaatcaa ttaaaaaata gatcagttta 6300
 aagaaagatc aaagctcaaa aaaataaaaa gagaaaaggg tcciaaccaa gaaaatgaag 6360
 gagaaaaact agaaatttac cctgtaggga tccatgttct aggatctggg tgtgtgtgtg 6420
 tgcgctccga acaacacgag gtiggggaaa gaggggtgtg aggggggtgc tatatttac 6480
 ggcgggcgag gaagggaag cgaaggagcg gtgggaaagg aatccccgt agctgccgtg 6540
 ccgtgagagg aggaggaggc cgccgtccgt gccggctcac gtcgtccgt cgcacgca 6600
 attctggat gccgacagcg gagcaagtc aacgggtggag cggaactct gagaggggtc 6660
 cagaggcagc gacagagatg ccgtgccgtc tgcctcgtt ggcccgacgc gacgtgtgtg 6720
 gtctgtgtg ttgtgtccgt tagactcgtc gacggcggtt aacaggctgg cattatctac 6780
 tcgaaacaag aaaaatgttt ccttagtttt ttttaattct taaagggtat ttgtttaatt 6840
 tttatgact ttattttatt ctattttata tctaaattat taaataaaaa aactaaaata 6900
 gagttttagt ttctttaatt tagaggctaa aatagaataa aatagatga ctaaaaaat 6960
 tagtctataa aaaccattaa ccctaaaccc taaatggatg tactaataaa atggatgaag 7020
 tattatatag gtgaagctat ttgcaaaaaa aaaggagaac acatgcacac taaaagata 7080
 aaactgtaga gtcctgttgt caaaatactc aattgtcctt tagaccaigt ctaactgttc 7140
 atttataiga ttctctaaaa cactgatatt attgtagtac tatagattat attattcgta 7200
 gagttaaagt taaatatatg tataaagata gataaactgc acitcaaaca agtgtgacaa 7260
 aaaaaataatg tggtaatttt ttataactta gacatgcaat gtcattatc tctagagagg 7320
 ggacgaccg ggtcacgtg cactgcaggc atgcaagctc ctaacatttt attagagagc 7380
 aggctagtgt cttagataga tgatcttcag gccgttattc gtcagggcaa gcgaaaattg 7440
 gccatttatg acgaccaatg ccccgagaa gctcccatc ttgccgcat agacgccgcg 7500
 cccccctttt ggggtgtaga acatcccttt gccagatgtg gaaaagaagt tcgttgtccc 7560
 attgttggca atgacgtagt agccggcgaa agtgcgagac ccatttgcgc tatatataag 7620
 cctacgattt ccgttgcgac tattgtcgta attggatgaa ctattatcgt agttgcctc 7680
 agagtgtcg taatttgaig gactattgtc gtaattgctt atggagtgt cgtagtgtgt 7740
 tggagaaaat tcgtagtgtg atggggagta gtcattaggga agacgagctt catccactaa 7800
 aacaattggc aggtcagcaa gtgcctgccc cgatgccatc gcaagiacga ggcttagaac 7860
 cacttcaac agatcgcgca tagtcttccc cagctctcta acgcttgagt taagccgcg 7920

cgcgaaagcgg cgtcggccttg aacgaattgt tagacattat ttgccgacta ccttgggtgat 7980
 ctgcgcctttc acgtagttaa caaatcttc caactgatct gcgcgcgagg ccaagcgatc 8040
 ttcttgtcca agataagcct gcctagcttc aagtaigacg ggctgatact gggccggcag 8100
 gcgctccatt gccagtcgg cagcgacatc cticggcgcg attttgccgg ttactgcgt 8160
 gtaccaaagt cgggacaacg taagcactac atttcgtca tcgccagccc agtcgggcgg 8220
 cgagttccat agcgtaaagg ttcatcttag cgctcaaat agatcctgtt caggaaccgg 8280
 atcaaagagt tcttcgcgcg ctggacctac caaggcaacg ctatgttctc ttgcttttgt 8340
 cagcaagata gccagatcaa tgcgatcgt ggctggctcg aagataacct caagaatgtc 8400
 attgcgctgc cattctccaa attgcagttc gcgcttagct ggataacgcc acggaatgat 8460
 gtcgtcgtgc acaacaatgg tgacttctac agcgcgagga atctcgtct ctccagggga 8520
 agccgaagtt iccaaaaggt cgttgatcaa agctcgccgc gttgtttcat caagccttac 8580
 ggtcaccgta accagcaaat caatatcact gtgiggcttc aggccgccat ccactgcgga 8640
 gccgtacaaa tgtacggcca gcaacgtcgg ttcgagatgg cgctcgatga cgccaactac 8700
 ctctgatagt tgagtcgata cticggcgat caccgcttcc ctcatgatgt ttaactcctg 8760
 aattaagccg cgccgcgaag cgggtgcggc ttgaatgaat tgttaggcgt catcctgtgc 8820
 tcccgagaac cagtaccagt acatcgtgt ttcgttcgag acttgaggtc tagttttata 8880
 cgtgaacagg tcaatgccgc cgagagttaa gccacatttt gcgtacaaat tgcaggcagg 8940
 tacattgttc gtttgtgtct ctaatcgtat gccaaaggagc tgtctgctta gtgccactt 9000
 tticgcaaat tcgatgagac tgtgcgcgac tcttttgcc cgggtgcgtgt gcgacacaac 9060
 aatgtgttcg atagaggcta gatcgttcca tgttagattg agttcaatct tcccgacaag 9120
 ctcttggtcg atgaatgcgc catagcaagc agagcttca tcagagtcac catccgagat 9180
 gtaatccttc cggtaggggc tcacacttct ggtagatagt tcaaagcctt ggtcggatag 9240
 gtgcacatcg aacacttcac gaacaatgaa atggttctca gcatccaatg ttccgccac 9300
 ctgctcaggg atcaccgaaa tcttcatatg acgcctaacg cctggcacag cggatcgcaa 9360
 acctggcgcg gcttttggca caaaaggcgt gacaggtttg cgaatccgtt gctgccactt 9420
 gttaaccctt ttgccagatt tggtaactat aatttatgtt agaggcgaag tcttgggtaa 9480
 aaactggcct aaaattgctg gggatttcag gaaagtaaac atcaccttcc ggctcgatgt 9540
 ctattgtaga tataatgtagt gtatctactt gatcggggga tctgtgctt cgcgcgcttc 9600
 ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccg agacggtcac agcttgtctg 9660

taagcggatg ccgggagcag acaagcccg cagggcgcg cagcgggtgt tggcgggtgt 9720
cggggcgag ccaigaccca gicacgtagc gatagcggag tglatactgg cttactatg 9780
cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc accatatgcg gttgigaaata ccgcacagat 9840
gcgttaaggag aaaataccgc atcaggcgct ctcccgcttc ctgcctcact gactcgttc 9900
gctcgggtgt tggcgtgcgg cgagcgggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat 9960
ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca 10020
ggaaccgtaa aaaggccgag ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc ctgacgagc 10080
atcacaaaaa tgcacgtca agtcagaggt ggcgaaacc gacaggacta taaagatacc 10140
aggcggtttc ccttggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgacctg ccgcttaccg 10200
gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgtgta 10260
ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgt ccaagciggg ctgtgtgcac gaacccccg 10320
ttcagccccg ccgctgcgc ttatccggtat actatcgtct tgagtcacac ccggttaagac 10380
acgacttatt gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag 10440
gcggtgctac agagtctttg aagtgggtgc ctactacgg ctacactaga aggacagtat 10500
ttggtatctg cgtctctgtg aagccagtt ccttcggaaa aagagtttgt agctcttgat 10560
ccggcaaaaa aaccaccgt ggtagcgggt gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc 10620
gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt 10680
ggaacgaaaa ctacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 10740
agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatai gagtaaacct 10800
ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctacgcgac tgtctatttc 10860
gttcatccat agttgctga ctccccgtc tgtagataac tacgatacgg gagggcttac 10920
catctggccc cagtctgca atgataccgc gagaccacg ctaccggct ccagatttat 10980
cagcaataaa ccagccagcc ggaaggggcg agcgagaag tggctctgca actttatccg 11040
cttccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata 11100
gtttgcgcaa cgttgttgcc atgtctgcag gggggggggg ggggggggac ttccattgtt 11160
cattccacgg acaaaaacag agaaaggaaa cgacagagcg caaaaagcct cgctttcagc 11220
accgtcgtt tctttcttt tcagagggtt ttttaaataa aaacattaag ttatgacgaa 11280
gaagaacgga aacgccttaa accggaaaa tttcataaat agcgaaaacc cgcgaggtcg 11340
ccgccccgtt acctgtcgga tcaccggaaa ggaccgtaa agtgataatg attatcatct 11400

acataatcaca acgtgcgtgg aggccatcaa accacgtcaa ataatacaatt atgacgcagg 11460
 tatcgtattia attgatctgc atcaacttaa cgtaaaaaca acttcagaca atacaaatca 11520
 gcgacactga atacggggca acctcatgtc cccccccccc cccccctgc aggcatcgtg 11580
 gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga 11640
 gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtcc tccgatcgtt 11700
 gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct 11760
 cttaactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca 11820
 ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgcctttgcc cggcgctaac acgggataat 11880
 accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga 11940
 aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgaacccac tctgtcaccc 12000
 aactgatctt cagcatcttt tactttacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg 12060
 caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc 12120
 ctttttcaat attatigaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt 12180
 gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gtccgcgcga catttccccg aaaagtcca 12240
 cctgacgtct aagaaacct tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg 12300
 aggccctttc gtcttcaaga attggctgac gatcttgctg cgttcggata ttttcgtgga 12360
 gttcccgcca cagaccgga tgaaggcga gatccagcaa ctgcgcgccag atcatcctgt 12420
 gacggaactt tggcgcgtga tgactggcca ggacgtcggc cgaaagagcg acaagcagat 12480
 cagccttttc gacagcgtcg gatttgcgat cgaggatttt tggcgctgc gctacgtccg 12540
 cgaccgcgtt gagggatcaa gccacagcag ccactcgcac ctcttagccg acccagacga 12600
 gccaaaggat ctttttggaa tgcgtctccg tcgtcaggct ttccgacgtt tgggtggttg 12660
 aacagaagtc attatcgtac ggaatgccaa gcactcccga ggggaacct gtggttggca 12720
 tgcacataca aatggacgaa cggataaacc ttttcacgcc cttttaataa tccgttattc 12780
 taataaacgc tcttttctct taggtttacc cgccaatata tctgtcaaa cactgatagt 12840
 ttaaaactgaa ggcgggaaac gacaatctga tcatgagcgg agaattaagg gattcacgtt 12900
 atgacccccg ccgatgacgc gggacaagcc gttttacgtt tggaactgac agaaccgcaa 12960
 cgttgaagga gccactcagc cc 12982

<210> 2

<211> 90

<212> DNA

<223> LB 配列を大文字で表す (1-25 及び 55-70)

<400> 2

ATTTACAATT GAATATATCC TGCCGccgct gccgcctttgc acccgATTTA CAATTGAATA 60
TATCCTGCCG ccgctgccgc ttgcacccg 90

<210> 3

<211> 90

<212> DNA

<400> 3

cgggtgcaaa gcggcagcgg cggcaggata tattcaattg taaatcgggt gcaaagcggc 60
agcggcggca ggatatattc aattgtaaat 90

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<400> 4

catttctcgc ttaaccgtga caggc 25

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<400> 5

aaaccgcagc agggaggcaa acaat 25



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05386

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N 15/82, A01H 5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N 15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG) , WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Plant Molecular Biology, 34, 1997 Allan Wenck et al., "Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during Agrobacterium-mediated transformation" pp.913-922	1-7
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 1986 Horsch RB et al., "Rapid assay of foreign gene expression in leaf discs transformed by Agrobacterium tumefaciens: role of T-DNA borders in the transfer process" pp.4428-4432	1-7
A	Plant Cell, 6, 1994 Martineau B. et al., "On defining T-DNA" pp.1032-1033	1-7
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, June 1986 George C. Jen et al., "The right border region of pTiT37 T-DNA is intrinsically more active than the left border region in promoting T-DNA transformation" pp.3895-3899	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
17 December, 1999 (17.12.99)

Date of mailing of the international search report
28 December, 1999 (28.12.99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05386

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Cell, 57, June 2, 1989 Guus Bakkeren et al, "Recovery of Agrobacterium tumefaciens T-DNA molecules from whole plants early after transfer", pp.847-857	1-7
A	Database BIOSIS on DIALOG, No.199900483906 Hanson Bill et al., "A simple method to enrich an Agrobacterium-transformed population for plants containing only T-DNA sequences", Plant Journal, 19(6), September, 1999, pp.727-734	1-7
A	Database BIOSIS on DIALOG, No.199598547959 Ramanathan V. et al., "Transfer of non-T-DNA portions of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of T-L-DNA", Plant Molecular Biology, 28(6), 1995, pp.1149-1154	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/82, A01H 5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)、WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Plant Molecular Biology, 34, 1997 Allan Wenck et al., "Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during Agrobacterium-mediated transformation" p. 913-922	1-7
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 1986 Horsch RB et al., "Rapid assay of foreign gene expression in leaf discs transformed by Agrobacterium tumefaciens: role of T-DNA borders in the transfer process" p. 4428-4432	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 12. 99

国際調査報告の発送日

28.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

印

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Plant Cell, 6, 1994 Martineau B. et al., "On defining T-DNA" p. 1032-1033	1 - 7
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, June 1986 George C. Jen et al., "The right border region of pTiT37 T-DNA is intrinsically more active than the left border region in promoting T-DNA transformation" p. 3895-3899	1 - 7
A	Cell, 57, June 2, 1989 Guus Bakkeren et al., "Recovery of Agrobacterium tumefaciens T-DNA molecules from whole plants early after transfer" p. 847-857	1 - 7
A	Database BIOSIS on DIALOG, No. 199900483906 Hanson Bill et al., "A simple method to enrich an Agrobacterium-transformed population for plants containing only T-DNA sequences" Plant Journal, 19(6), Sep. 1999 p. 727-734	1 - 7
A	Database BIOSIS on DIALOG, No. 199598547959 Ramanathan V. et al., "Transfer of non-T-DNA portions of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of T-L-DNA" Plant Molecular Biology, 28(6), 1995 p. 1149-1154	1 - 7

E P



P C T

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-441	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/05386	国際出願日 (日.月.年) 30.09.99	優先日 (日.月.年)
出願人(氏名又は名称) 日本たばこ産業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☐ 出願人が提出したものを承認する。
☒ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
 第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Plant Cell, 6, 1994 Martineau B. et al., "On defining T-DNA" p. 1032-1033	1 - 7
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, June 1986 George C. Jen et al., "The right border region of pTiT37 T-DNA is intrinsically more active than the left border region in promoting T-DNA transformation" p. 3895-3899	1 - 7
A	Cell, 57, June 2, 1989 Guus Bakkeren et al., "Recovery of Agrobacterium tumefaciens T-DNA molecules from whole plants early after transfer" p. 847-857	1 - 7
A	Database BIOSIS on DIALOG, No. 199900483906 Hanson Bill et al., "A simple method to enrich an Agrobacterium-transformed population for plants containing only T-DNA sequences" Plant Journal, 19(6), Sep. 1999 p. 727-734	1 - 7
A	Database BIOSIS on DIALOG, No. 199598547959 Ramanathan V. et al., "Transfer of non-T-DNA portions of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of T-L-DNA" Plant Molecular Biology, 28(6), 1995 p. 1149-1154	1 - 7

第Ⅲ欄 要約 (第1ページの5の続き)

本発明は、アグロバクテリウムを利用した植物の形質転換のためのベクターを改変し、アグロバクテリウムのvirタンパク質群がベクターのボーダー配列を認識する確率を高め、T-DNA以外のDNAが植物の染色体に移される確率を低くする。

本発明は、詳細には、アグロバクテリウムのvirタンパク質群によって認識されうる右ボーダー配列及び左ボーダー配列、それらのボーダー配列間に配置され、かつ植物へ導入しようとする遺伝子が挿入可能なT-DNA配列、並びに細菌での前記ベクターの複製を可能にする複製開始点を有する植物の形質転換用ベクターであって、左ボーダー配列が複数個配置されたことを特徴とするベクターを提供する。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/82, A01H 5/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)、WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Plant Molecular Biology, 34, 1997 Allan Wenck et al., "Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during Agrobacterium-mediated transformation" p. 913-922	1-7
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 1986 Horsch RB et al., "Rapid assay of foreign gene expression in leaf discs transformed by Agrobacterium tumefaciens: role of T-DNA borders in the transfer process" p. 4428-4432	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 12. 99

国際調査報告の発送日

20.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生



4 B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

PCT REQUEST

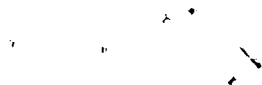
0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	30.9.99
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.84 (updated 01.07.1999)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	Japanese Patent Office (RO/JP)
0-7	Applicant's or agent's file reference	YCT-441
I	Title of invention	PLANT TRANSFORMATION VECTORS
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	JAPAN TOBACCO INC.
II-5	Address:	2-1, Toranomom 2-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8422 Japan
II-6	State of nationality	JP
II-7	State of residence	JP
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	KURAYA, Yoshiki
III-1-5	Address:	c/o JAPAN TOBACCO INC., Plant Breeding and Genetics Research Laboratory 700, Higashibara, Toyoda-cho, Iwata-gun, Shizuoka 438-0802 Japan
III-1-6	State of nationality	JP
III-1-7	State of residence	JP

PCT REQUEST

YCT-441

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	KOMARI, Toshihiko
III-2-5	Address:	c/o JAPAN TOBACCO INC., Plant Breeding and Genetics Research Laboratory 700, Higashibara, Toyoda-cho, Iwata-gun, Shizuoka 438-0802 Japan
III-2-6	State of nationality	JP
III-2-7	State of residence	JP
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is:	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	HIEI, Yukoh
III-3-5	Address:	c/o JAPAN TOBACCO INC., Plant Breeding and Genetics Research Laboratory 700, Higashibara, Toyoda-cho, Iwata-gun, Shizuoka 438-0802 Japan
III-3-6	State of nationality	JP
III-3-7	State of residence	JP
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	SHAMOTO, Ichio
IV-1-2	Address:	YUASA AND HARA Section 206, New Ohtemachi Bldg, 2-1, Ohtemachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004 Japan
IV-1-3	Telephone No.	03-3270-6641
IV-1-4	Facsimile No.	03-3246-0233
IV-1-5	e-mail	yulawpat@yuasa-hara.co.jp
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	IMAI, Shosuke; MASUI, Chuji; KURITA, Tadahiko; KOBAYASHI, Yasushi; EJIRI, Hiroko
V	Designation of States	
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT

V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AU CA CN JP KR US	
V-5	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.		
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE	
VI	Priority claim	NONE	
VII-1	International Searching Authority Chosen	Japanese Patent Office (JPO) (ISA/JP)	
VIII	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
VIII-1	Request	5	-
VIII-2	Description (excluding sequence listing part)	10	-
VIII-3	Claims	1	-
VIII-4	Abstract	1	-
VIII-5	Drawings	2	-
VIII-6	Sequence listing part of description	9	-
VIII-7	TOTAL	28	
	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
VIII-8	Fee calculation sheet	✓	-
VIII-15	Nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form		-
VIII-16	PCT-EASY diskette	-	diskette
VIII-18	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
VIII-19	Language of filing of the international application	Japanese	
IX-1	Signature of applicant or agent		
IX-1-1	Name (LAST, First)	SHAMOTO, Ichio (seal)	
IX-2	Signature of applicant or agent		
IX-2-1	Name (LAST, First)	IMAI, Shosuke (seal)	
IX-3	Signature of applicant or agent		
IX-3-1	Name (LAST, First)	MASUI, Chuji (seal)	
IX-4	Signature of applicant or agent		
IX-4-1	Name (LAST, First)	KURITA, Tadahiko (seal)	



PCT REQUEST

YCT-441

IX-5	Signature of applicant or agent	
IX-5-1	Name (LAST, First)	KOBAYASHI, Yasushi (seal)
IX-6	Signature of applicant or agent	
IX-6-1	Name (LAST, First)	EJIRI, Hiroko (seal)

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/JP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

